

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

|  |  |  |   |
|--|--|--|---|
| (51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :<br><b>C07K 16/28, A61K 39/395, G01N 33/577, 33/574</b>   |  | A1   | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 98/52975</b><br><br>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>26. November 1998 (26.11.98)</b> |
| (21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/DE98/01409</b>   |  | (81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).   |   |
| (22) Internationales Anmeldedatum: <b>22. Mai 1998 (22.05.98)</b>  |  | <b>Veröffentlicht</b><br><i>Mit internationalem Recherchenbericht.<br/>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i> |   |
| (30) Prioritätsdaten:<br><b>197 21 700.1                    23. Mai 1997 (23.05.97)                    DE</b>  |  |  |   |
| (71) Anmelder ( <i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i> ):<br><b>DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE).</b>   |  |  |   |
| (72) Erfinder; und   |  |  |   |
| (75) Erfinder/Anmelder ( <i>nur für US</i> ): <b>LITTLE, Melvyn [GB/DE]; Fritz-von-Briesen-Strasse 10, D-69151 Neckargemünd (DE). KIPRIYANOV, Sergey [RU/DE]; Furtwänglerstrasse 3, D-69121 Heidelberg (DE). MOLDENHAUER, Gerhard [DE/DE]; Brückengasse 41, D-69120 Heidelberg (DE).</b> |  |  |   |
| (74) Anwalt: <b>HUBER, Bernard; Huber &amp; Schüßler, Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).</b>   |  |  |   |

**(54) Title:** MUTATED OKT3 ANTIBODY**(54) Bezeichnung:** MUTIERTER OKT3-ANTIKÖRPER**(57) Abstract**

The invention relates to an H100A position point-mutated OKT3 antibody, and to a method for the production and use thereof.

**(57) Zusammenfassung**

Die vorliegende Erfindung betrifft einen durch eine Punktmutation an Position H100A mutierten OKT3-Antikörper, Verfahren zu seiner Herstellung sowie seine Verwendung.

#### **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

**Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.**

|    |                              |    |                                   |    |   |    |                                |
|----|------------------------------|----|-----------------------------------|----|---|----|--------------------------------|
| AL | Albanien                     | ES | Spanien                           | LS | Lesotho   | SI | Slowenien                      |
| AM | Armenien                     | FI | Finnland                          | LT | Litauen   | SK | Slowakei                       |
| AT | Österreich                   | FR | Frankreich                        | LU | Luxemburg                                       | SN | Senegal                        |
| AU | Australien                   | GA | Gabun                             | LV | Lettland  | SZ | Swasiland                      |
| AZ | Aserbaidschan                | GB | Vereinigtes Königreich            | MC | Monaco  | TD | Tschad                         |
| BA | Bosnien-Herzegowina          | GE | Georgien                          | MD | Republik Moldau                                 | TG | Togo                           |
| BB | Barbados                     | GH | Ghana                             | MG | Madagaskar                                      | TJ | Tadschikistan                  |
| BE | Belgien                      | GN | Guinea                            | MK | Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien | TM | Turkmenistan                   |
| BF | Burkina Faso                 | GR | Griechenland                      | ML | Mali  | TR | Türkei                         |
| BG | Bulgarien                    | HU | Ungarn                            | MN | Mongolei  | TT | Trinidad und Tobago            |
| BJ | Benin                        | IE | Irland                            | MR | Mauretanien                                     | UA | Ukraine                        |
| BR | Brasilien                    | IL | Israel                            | MW | Malawi  | UG | Uganda                         |
| BY | Belarus                      | IS | Island                            | MX | Mexiko  | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| CA | Kanada                       | IT | Italien                           | NE | Niger   | UZ | Usbekistan                     |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan                             | NL | Niederlande                                     | VN | Vietnam                        |
| CG | Kongo                        | KE | Kenia                             | NO | Norwegen  | YU | Jugoslawien                    |
| CH | Schweiz                      | KG | Kirgisistan                       | NZ | Neuseeland                                      | ZW | Zimbabwe                       |
| CI | Côte d'Ivoire                | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | PL | Polen   |    |                                |
| CM | Kamerun                      | KR | Republik Korea                    | PT | Portugal  |    |                                |
| CN | China                        | KZ | Kasachstan                        | RO | Rumänien  |    |                                |
| CU | Kuba                         | LC | St. Lucia                         | RU | Russische Föderation                            |    |                                |
| CZ | Tschechische Republik        | LI | Liechtenstein                     | SD | Sudan   |    |                                |
| DE | Deutschland                  | LK | Sri Lanka                         | SE | Schweden  |    |                                |
| DK | Dänemark                     | LR | Liberia                           | SG | Singapur  |    |                                |

### Mutierter OKT3-Antikörper

Die vorliegende Erfindung betrifft einen durch eine Punktmutation an Position H100A mutierten OKT3-Antikörper, Verfahren zu seiner Herstellung sowie seine  
5 Verwendung.

OKT3 ist ein aus Maus stammender monoklonaler Antikörper vom IgG 2a-Typ, der ein Epitop einer  $\epsilon$ -Untereinheit des menschlichen CD3-Komplexes erkennt (Kung et al., Science 206, S. 347-349 (1979); Van Wauwe et al., J. Immunol.

10 124, S. 2708-2713 (1980); Transy et al., Eur. J. Immunol. 19, S. 947-950 (1989)). Das Verfahren, den monoklonalen Antikörper aus dem entsprechenden Hybridom zu erhalten, ist in diesen Druckschriften im Detail beschrieben. Außerdem wurde die OKT3 produzierende Hybridomazelllinie am 26. April 1979 unter

15 der ATCC-Nummer CRL 8001 bei der American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, 20852 von der Inhaberin des EP-Patents 0 018 795 hinterlegt. OKT3 wird seit langem benutzt, um eine T-Zellantwort zu unterdrücken und dadurch die Abstoßung von Transplantaten zu verhindern (Thistlethwaite et al., Transplantation 38, S. 695-701 (1984); Woodle et al., Transplantation 51, S. 1207-1212 (1991)). Andererseits kann durch OKT3 auch eine

20 T-Zell-Aktivierung und Proliferation ausgelöst werden, die Effektorzellen anregt, was bei der adoptiven Krebs-Immuntherapie eingesetzt werden kann (Yannelli et al., J. Immunol. Meth. 1, S. 91-100 (1990)). OKT3 wurde sowohl alleine als auch als Komponente eines bispezifischen Antikörpers eingesetzt, um cytotoxische T-Lymphozyten gegen Tumorzellen oder Virus-infizierte Zellen zu richten

25 (Nitta et al., Lancet 335, S. 368-376 (1990); Sanna et al., Bio/Technology 13, S. 1221-1224 (1995)). Außerdem sind auch humanisierte Versionen des OKT3-monoklonalen Antikörpers, die in COS-Zellen exprimiert wurden, bekannt (Woodle et al., J. Immunol. 148, S. 2756-2763 (1992); Adair et al., Human. Antibod. Hybridomas, S. 41-47 (1994)). Bisher bestand aber das Problem, daß OKT3

30 keine ausreichende Stabilität aufweist und insbesondere sich nicht in bekannten

- 2 -

rekombinannten Expressionssystemen stabil und in genügender Menge exprimieren läßt.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand deshalb darin, OKT3 rekombinant zu exprimieren und einen Antikörper zu erhalten, der eine befriedigende Stabilität aufweist.

Die Aufgabe wird durch die Gegenstände der Patentansprüche gelöst.

10 Von den Erfindern wurde gefunden, daß durch Einbringen einer Punktmutation an Position H100A der Aminosäuresequenz von OKT3 die Stabilität um ein Vielfaches zunimmt. Diese Punktmutation betrifft den Austausch von Cystein gegen eine andere polare Aminosäure, bevorzugt Serin, in der Aminosäuresequenz von OKT3.

15 Zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Antikörpers wird von mRNA aus frisch subklonierte Hybridomazellen von OKT3 ausgegangen. Die cDNA wird nach den dem Fachmann bekannten Methoden, die beispielsweise in Dübel et al., J. Immunol. Methods 175, S. 89-95 (1994) beschrieben wurden, hergestellt. Die für die variable Domäne der leichten Kette kodierende DNA kann mittels PCR unter Verwendung geeigneter Primer, z.B. mittels der Primer Bi5 and Bi8, die an den aminoterminalen Teil der konstanten Domäne der  $\kappa$ -Kette und die "Framework 1 (FR1)-Region der variablen Domäne der  $\kappa$ -Kette hybridisieren, hergestellt werden (Dübel et al., vgl. vorstehend). Für die Amplifikation der DNA, die für die variable Domäne der schweren Kette codiert, können beispielsweise der Primer Bi4, der an den aminoterminalen Teil der konstanten Domäne 1 der  $\gamma$ -Kette hybridisiert (Dübel et al., vgl. vorstehend) und der Primer Bi3f, der an die FR1-Region der schweren Kette hybridisiert (Gotter et al., Tumor Targeting 1, S. 107-114 (1995), verwendet werden.

20  
25  
30 Die amplifizierte DNA wird danach in einen für die Sequenzierung und für "site-specific mutagenesis" geeigneten Vektor, wie er dem Fachmann bestens be-

- 3 -

kannt sind, inseriert. Beispielsweise kann der von der Firma Stratagene vertriebene Vektor pCR-Skript SK(+) verwendet werden. Mutationen werden in der von OKT3 stammenden  $\nu_H$ -Domäne durch gerichtete Mutagenese ("site specific mutagenesis") eingebracht. Die dafür notwendigen Bedingungen sind dem Fachmann bekannt, beispielsweise auch in Kunkel et al., Meth. Enzymol. 154, S. 367-382 (1987) beschrieben. Die Aminosäuresubstitution an der Position H100A von OKT3 (Austausch von Cystein) wird geeigneterweise unter Verwendung des Primers SK1 5'-GTAGTCAAGGCTGTAATGATCATC durchgeführt, falls ein Austausch gegen Serin an dieser Position ausgeführt werden soll.

10

Die so veränderte DNA kann danach in einen Vektor bzw. Expressionsvektor kloniert werden. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines Expressionsvektors sind dies pGEMEX, pUC-Derivate oder pET3b. Für die Expression in Hefe sind z.B. pY100 und Ycpad 1 zu nennen, während für die Expression in tierischen Zellen z.B. pKCR, pEFBOS, cDM8 und pCEV4 anzugeben sind. Für die Expression in Insektenzellen eignet sich besonders der Baculovirus-Expressionsvektor pAcSGHisNT-1. Die Expression in E. coli ist erfindungsgemäß bevorzugt, wofür vorzugsweise der in Fig. 1 gezeigte Vektor pHOG21 (Kipriyanov et al., J. Immunol. Methods 196, S. 51-62 (1996) eingesetzt wird, worin das mutierte OKT3-Einzelketten(scFv)-Gen als Ncol/BamHI DNA-Fragment insertiert ist. Es kommt zur Expression eines an der Position 100 A (Kabat-Nummerierungssystem) mutierten einzelkettigen Antikörpers OKT3, der die in Fig. 2 gezeigte Sequenz aufweist.

15

Der Fachmann kennt geeignete Zellen, um eine in einem Expressionsvektor vorliegende DNA zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die E. coli-Stämme HB101, DH1, x1776, JM101, JM109, Bl21 und SG 13009, den Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* und die tierischen Zellen 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero und Hela sowie die Insektenzellen sf9. Bevorzugt ist die Verwendung der von der Firma Stratagene vertriebenen XL1-Blue E. coli-Zellen.

30  
Der Fachmann weiß, in welcher Weise eine DNA in einen Expressionsvektor

insertiert werden muß. Ihm ist auch bekannt, daß diese DNA in Verbindung mit ein r für ein and res Protein bzw. Peptid kodierenden insertiert werden kann, so daß die DNA in Form eines Fusionsproteins exprimiert werden kann, beispielsweise in Form eines His-Fusionsproteins. Die dafür notwendige Information ist im vorzugsweise verwendeten Plasmid pHOG21 enthalten. Weiter kann die mutierte Form von OKT3 in Form eines bispezifischen Antikörpers, z.B. in Verbindung mit einem Antikörper gegen menschlichen CD19-Komplex vorliegen. Die Sequenz eines solchen bispezifischen Antikörpers ist in Fig. 3 gezeigt.

10 Erfindungsgemäße Antikörper zeichnen sich dadurch aus, daß sie mittels rekombinanter Methoden in ausreichender Menge hergestellt werden können und eine im Vergleich zum unmutierten monoklonalen Antikörper OKT3 größere Stabilität aufweist. Diese äußert sich beispielsweise darin, daß der mutierte Antikörper auch noch nach einem Monat Lagerung bei 4°C in PBS kaum von seiner 15 ursprünglichen Bindungsaffinität eingebüßt hat, wohingegen OKT3 unter diesen Bedingungen bereits deutlich an Bindungsaffinität verloren hat (46%). Außerdem hat der erfindungsgemäße Antikörper den Vorteil, daß er als Einzelkettenantikörper (scFv) eine schnellere Blut-Clearance und eine bessere Tumorpenetration aufweist. Weiter sind ScFv's sehr nützliche Moleküle, um Arzneistoffe, Toxine 20 oder Radionuklide an Tumorstellen zu bringen, was in der Tumordiagnostik und -therapie wichtig ist.

Die vorliegende Erfindung wird weiter anhand der Figuren beschrieben.

25 Fig. 1: Plasmid pHOG21  
wobei die verwendeten Abkürzungen folgende Bedeutungen haben:  
Ap<sup>R</sup>: Ampicillin-Resistenzgen  
c-myc: Sequenz codierend für ein Epitop, das durch  
den monoklonalen Antikörper 9E10 (Cambridge  
Research Biochemicals, Cambridge, Großbritan-  
nien) erkannt wird  
ColE1: Ursprung der DNA-Replikation

- 5 -

|   |                    |   |
|---|--------------------|---|
|   | fl IG:             | Intergene Region des f1-Phagen  |
|   | His <sub>6</sub> : | Sequenz codierend für 6 Histidinreste   |
|   | linker:            | Sequenz codierend für 17 Aminosäuren, die die v <sub>H</sub> - und v <sub>L</sub> -Domäne verbindet |
| 5 | peIB:              | Signalpeptidsequenz für bakterielle Pektatlyase   |
|   | P/O:               | Wildtyp-Lac-Promotor/Operator   |

Fig. 2: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz des mutierten OKT3-Einzelkettenantikörpers

10

Fig. 3: Bispezifischer Antikörper zusammengesetzt aus mutiertem OKT3 und anti-CD19

15

Die Erfindung wird weiter anhand des Beispiels erläutert.

#### BEISPIEL 1: Herstellung eines erfindungsgemäßen Antikörpers

Die Isolation von mRNA aus frisch subklonierten Hybridomazellen von OKT3 und die cDNA-Synthese wurde, wie in "Dübel et al., J. Immunol. Methods 175, S. 89-95 (1994)" beschrieben durchgeführt. Die für die variable Domäne der leichten Kette kodierende DNA wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer Bi5 and Bi8, die an den aminoterminalen Teil der konstanten Domäne der κ-Kette und die "Framework 1 (FR1)-Region der variablen Domäne der κ-Kette hybridisieren, hergestellt (Dübel et al., vgl. vorstehend). Für die Amplifikation der DNA, die für die variable Domäne der schweren Kette codiert, wurde der Primer Bi4, der an den aminoterminalen Teil der konstanten Domäne 1 der γ-Kette hybridisiert (Dübel et al., vgl. vorstehend) und der Primer Bi3f, der an die FR1-Region der schweren Kette hybridisiert (Gotter et al., Tumor Targeting 1, S. 107-114 (1995), verwendet. Das 50 µl Reaktionsgemisch enthielt 10 pmol jedes Primers und 50 ng Hybridoma cDNA, 100 µM jedes der dNTPs, 1x Vent-Puffer (Boehringer Mannheim), 5 µg BSA und 1 U Vent DNA-Polymerase. Es wurden 30 Zyklen

- 6 -

je 1 Minute bei 95°C, 1 Min. bei 55°C und 2 Minuten bei 75°C in einem PCR-Thermozykler durchgeführt. Die amplifizierte DNA wurde mit einem QIAquick PCR-Reinigungskit (Qiagen, Hilden) gereinigt.

5 Die amplifizierte DNA wurde danach in den von der Firma Stratagene vertriebenen Vektor pCR-Skript SK(+), der mit dem Restriktionsenzym SrfI geschnitten worden war, "blunt-end" ligiert. Mutationen wurden in der von OKT3 stammenden v<sub>H</sub>-Domäne durch gerichtete Mutagenese ("site specific mutagenesis") eingebracht (Kunkel et al., Meth. Enzymol. 154, S. 367-382 (1987)). Die  
10 Aminosäuresubstitution an der Position H100A von OKT3 (Austausch von Cystein gegen Serin) wurde unter Verwendung des Primers SK1 5'-GTAGT-CAAGGCTGTAATGATCATC durchgeführt.

Für die Expression der erhaltenen mutierten DNA wurde der in Fig.1 gezeigte  
15 Vektor pHOG21 (Kipriyanov et al., J. Immunol. Methods 196, S. 51-62 (1996) eingesetzt, worin das mutierte OKT3-Einzelketten(scFv)-Gen als Ncol/BamHI DNA-Fragment inseriert ist. XL1-Blue E. coli-Zellen (Stratagene) wurden mit diesem Expressionsvektor transformiert und über Nacht in 2xYT-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin und 100 mM Glucose (2xYT<sub>GA</sub>) bei 37°C wachsen gelassen.  
20 Verdünnungen (1:50) der Übernachtkulturen in 2xYT<sub>GA</sub> wurden bei 37°C unter Schütteln bei 37°C wachsen gelassen. Sobald die Kulturen OD<sub>600</sub> = 0,8 erreichten, wurden die Bakterien durch Zentrifugation bei 1500 g für 10 Minuten und 20°C pelletiert und im gleichen Volumen frischem 2xYT-Medium enthaltend 50µg/ml Ampicillin und 0,4 M Sucrose resuspendiert. Es wurde IPTG auf eine  
25 Endkonzentration von 0,1 mM zugesetzt und das Wachstum bei Raumtemperatur für 20 Std. fortgesetzt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 5000g für 10 Minuten und 4°C geerntet. Der Kulturüberstand wurde auf Eis aufbewahrt. Um lösliche periplasmatische Proteine zu isolieren, wurden die pelletierten Bakterien in eiskaltem 50 mM Tris-HCl, 20% Sucrose, 1 mM EDTA, pH 8,0 (5% des Ursprungsvolumens) aufgenommen. Nach einer Stunde Inkubation auf Eis mit gelegentlichem Rühren wurden Spheroplasten bei 30000 g für 30 Minuten und 4°C abzentrifugiert, wobei der lösliche periplasmatische Extrakt als Über-

- 7 -

stand und die Spherozlasten plus unlösliches periplasmatisches Material als Pellet anfiel n. Der vorst hend auf Eis aufbewahrte Kulturüb rstand und der lösliche periplasmatische Extrakt wurden kombiniert und durch eine zusätzliche Zentrifugation (30000 g, 4°C, 40 Min.) geklärt. Nach Filtrationen durch Glasfilter mit einer Porengröße von 10-16 µm und dann 0,2 µm wurde das Volumen 5 10-fach durch Konzentration mit Amicon YM10 Membranen (Amicon, Witten). Der konzentrierte Überstand wurde durch Zentrifugation geklärt und gegen 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,0 bei 4°C dialysiert. Immobilisierte Metall-Affinitätschromatografie (IMAC) wurde bei 4°C unter Verwendung einer 5 ml Säule 10 von chelatisierender Sepharose (Pharmacia) beladen mit Ni<sup>2+</sup> und equilibriert mit 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,0 (Startpuffer) durchgeführt. Auf der Säule adsorbiertes Material wurde mit 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 250 mM Imidazol, pH 7,0 eluiert. Nach Pufferwechsel zu 50 mM MES, pH 6,0 wurde das Protein 15 weiter auf einer Mono S Ionenaustauschsäule (Pharmacia) gereinigt. Der erfindungsgemäße gereinigte scFv-Antikörper wurde in PBS (15 mM Natriumphosphat, 0,15 M NaCl, pH 7,4) dialysiert. Für einen längere Aufbewahrung wurde der Antikörper in Anwesenheit von BSA (Endkonzentration 10 mg/ml) eingefroren und bei -80°C gelagert.

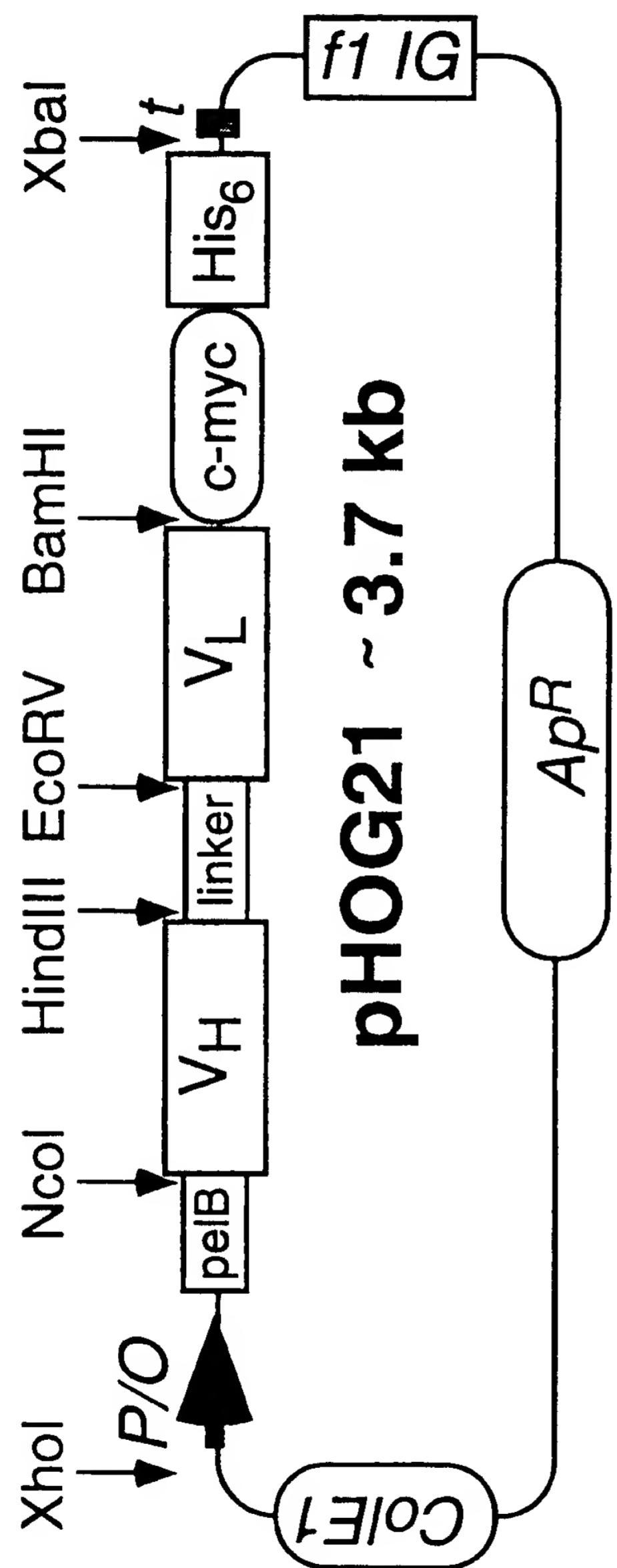
**Patentansprüche**

5

- 1) Monoklonaler Antikörper gekennzeichnet durch einen Austausch von Cystein gegen eine andere polare Aminosäure an Position H100A des unter der Bezeichnung bekannten Antikörpers OKT3.
  
- 10 2) Monoklonaler Antikörper, dadurch gekennzeichnet, daß die polare Aminosäure Serin ist.
  
- 15 3) Monoklonaler Antikörper nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß dieser die in Fig. 2 angegebene Sequenz aufweist.
  
- 4) Verfahren zur Herstellung des monoklonaler Antikörpers nach einem der Ansprüche 1 bis 3 gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:
  - 20 a) Gewinnen von mRNA aus frisch subklonierte Hybridomazellen von OKT3 und Umschreibung zu cDNA
  
  - b) Amplifikation der für die variablen Domänen der leichten und schweren Kette kodierenden DNA mittels PCR unter Verwendung geeigneter Primer,
  
  - 25 c) Klonierung der unter b) erhaltenen DNA in einen zur gerichteten Mutagenese geeigneten Vektor sowie Einführung der gewünschten Mutation unter Verwendung geeigneter Primer,
  
  - 30 d) Insertion der unter c) erhaltenen mutierten DNA in einem Expressionsvektor und Expression in einem geeigneten Expressionssystem.

- 9 -

- 5) Verfahren nach Anspruch 4, wobei die in Schritt b) verwendeten Primer Bi5, Bi8, Bi4 und Bi3f sind.
- 6) Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, wobei der in Schritt c) verwendete Vektor pCR-Skript SK(+) ist.
- 7) Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 6, wobei in Schritt c) der Primer SK1 5'-GTAGTCAAGGCTGTAATGATCATC verwendet wird.
- 10 8) Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 7, wobei der in Schritt d) verwendete Expressionsvektor pHOG21 ist.
- 9) Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 8, wobei die Expression in XL1-Blue E. coli-Zellen erfolgt.
- 15 10) Verwendung des monoklonalen Antikörpers nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Verminderung oder Ausschaltung einer Transplantatabstoßung durch einen Organtransplantatempfänger.
- 20 11) Verwendung des monoklonalen Antikörpers nach einem der Ansprüche 1 bis 3 in der Tumordiagnostik oder -therapie.



**Fig. 1**



**EcoRI** RBS PeiB leader  
 1 GAATT CATTAAAGGAGGAGAATT AACCATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGCTTGCTG  
 1► M K Y L L P T A A A G L L  
 NcoI ◆ VH anti-CD3 Frame-H1  
 67 CTGCTGGCAGCTCAGCCGGCCATGGCGCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGCAAGAC  
 14► L L A A Q P A M A Q V Q L Q Q S G A E L A R  
 CDR-H1  
 134 CTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTACTAGGTACACGATGCA  
 36► P G A S V K M S C K A S G Y T F T R Y T M H  
 Frame-H2 CDR-H2  
 198 CTGGGTAAAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGATGGATACATTAATCCTAGCCGTGG  
 57► W V K Q R P G Q G L E W I G Y I N P S R G  
 Frame-H3  
 261 TTATACTAATTACAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTACAGACAAATCCTCCA  
 78► Y T N Y N Q K F K D K A T L T T D K S S  
 323 GCACAGCCTACATGCAACTGAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATA  
 99► S T A Y M Q L S S L T S E D S A V Y Y C A R Y  
 CDR-H3 Frame-H4  
 390 TTATGATGATCATTACAGCCTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCCTCACAGTCTCCTCAG  
 121► Y D D H Y S L D Y W G Q G T T L T V S S  
 CH1 Linker VL anti-CD19 Frame-L1  
 452 CCAAAACAACACCCAAGCTTGGCGGTGATATCTGCTCACCAAACTCCAGCTCTGGCTGTG  
 142► A K T T P K L G G D I L L T Q T P A S L A V  
 CDR-L1  
 517 TCTCTAGGGCAGAGGGCCACCATCTCCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTGATTATGATGGTGA  
 164► S L G Q R A T I S C K A S Q S V D Y D G D  
 Frame-L2  
 579 TAGTTATTTGAACTGGTACCAACAGATTCCAGGACAGCCACCCAACTCCTCATCTATGATGCA  
 184► S Y L N W Y Q Q I P G Q P P K L L I Y D A  
 CDR-L2 Frame-L3  
 643 TCCAATCTAGTTCTGGGATCCCACCCAGGTTAGTGGCAGTGGTCTGGGACAGACTCACCC  
 206► S N L V S G I P P R F S G S G S G T D F T  
 CDR-L3  
 707 TCAACATCCATCCTGTGGAGAAGGTGGATGCTGCAACCTATCATGTCAAGCAAAGTACTGAGGA  
 227► L N I H P V E K V D A A T Y H C Q Q S T E D  
 Frame-L4 C kappa NotI  
 771 TCCGTGGACGTTGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGGGCTGATGCTGCGGCCGCTGGATCC  
 248► P W T F G G G T K L E I K R A D A A A A G S  
 c-myc epitope His6 tail BgIII  
 838 GAACAAAAGCTGATCTCAGAAGAACCTAAACTCACATCACCACACTAAAGAT  
 271► E Q K L I S E E D L N S H H H H H H H H H H  
 899 CT

Fig. 3

BgIII RBS Pel B leader

1 AGATCTATTAAAAGAGGGAGAAATTAACCATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGCTTGC  
 1► M K Y L L P T A A A A G L  
 Ncol • VH anti-CD19 Frame-H1  
 65 TGCTGCTGGCAGCTCAGCCGCCATGGCGCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGT  
 13► L L L A A Q P A M A Q V Q L Q Q S G A E L V  
 CDR-H1  
 129 GAGGCCTGGTCCTCAGTGAAGATTCTGCAGGCTCTGGCTATGCATTCAGTAGCTACTG  
 34► R P G S S V K I S C K A S G Y A F S S Y W  
 Frame-H2  
 192 GATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCTTGAGTGGATTGGACAGATTGGCCT  
 55► M N W V K Q R P G Q G L E W I G Q I W P  
 CDR-H2  
 253 GGAGATGGTGATACTAACTACAATGGAAAGTTCAAGGGTAAAGCCACTCTGACTGCA  
 76► G D G D T N Y N G K F K G K A T L T A  
 Frame-H3  
 310 GACGAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTAGCATCTGAGGACTCTGCGGTCT  
 95► D E S S S T A Y M Q L S S L A S E D S A V  
 CDR-H3  
 374 ATTTCTGTGCAAGACGGGAGACTACGACGGTAGGCCGTTATTACTATGCTATGGACT  
 116► Y F C A R R E T T T V G R Y Y Y A M D  
 Frame-H4 CH1 Linker  
 431 ACTGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACAACACCCAAAGCTTGGCGGT  
 135► Y W G Q G T S V T V S S A K T T P K L G G  
 VL anti-CD3 Frame-L1  
 493 GATATCGTGCTCACTCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCAGGGAGAAGGTACCATGA  
 156► D I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T M  
 CDR-L1 Frame-L2  
 557 CCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAAGTTACATGAACTGGTACCAAGCAGAAGTCAGGCACC  
 177► T C S A S S S V S Y M N W Y Q Q K S G T  
 CDR-L2  
 616 TCCCCCAAAGATGGATTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCACTTC  
 197► S P K R W I Y D T S K L A S G V P A H F  
 Frame-L3  
 676 AGGGGCAGTGGGTCTGGACCTCTTACTCTCACAATCAGCGGCATGGAGGCTGAAGATGCTG  
 217► R G S G S G T S Y S L T I S G M E A E D A  
 CDR-L3 Frame-L4  
 740 CCACCTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCATTCACACGTTGGCTCGGGACAAAG  
 238► A T Y Y C Q Q W S S N P F T F G S G T K  
 C kappa c-myc epitope  
 799 TTGGAAATAACCGGGCTGATACTGCACCAACTGGATCCGAAACAAAAGCTGATCTCAGAA  
 258► L E I N R A D T A P T G S E Q K L I S E  
 His6 tail XbaI  
 859 GAAGACCTAAACTCACATCACCATCACCATCATAATCTAGA  
 278► E D L N S H H H H H H H .

Fig. 3 (Fortsetzung)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No

PCT/DE 98/01409

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

IPC 6 C07K16/28 A61K39/395 G01N33/577 G01N33/574

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|----------|--|-----------------------|
| X        | <p>S. KIPRIYANOV ET AL.: "Two amino acid mutations in an anti-human CD3 single-chain Fv antibody fragment that affect the yield on bacterial secretion but not the affinity."<br/> <b>PROTEIN ENGINEERING</b>,<br/> vol. 10, no. 4, April 1997, pages 445-453.<br/> XP002079905<br/> Oxford, GB<br/> see the whole document</p> <p>---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p> | 1-11                  |

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 October 1998

Date of mailing of the international search report

21/10/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Nooij, F

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No

PCT/DE 98/01409

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| A          | <p>S. KIPRIYANOV ET AL.: "Rapid detection of recombinant antibody fragments directed against cell-surface antigens by flow cytometry." JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, vol. 196, no. 1, 13 September 1996, pages 51-62, XP002079906 Amsterdam, NL cited in the application see "Material &amp; Methods"</p> <p>---</p>                 | 1-11                  |
| A          | <p>S. DÜPEL ET AL.: "Isolation of IgG antibody Fv-DNA from various mouse and rat hybridoma cell lines using the polymerase chain reaction with a simple set of primers." JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, vol. 175, no. 1, 30 September 1994, pages 89-95, XP002079907 Amsterdam, NL cited in the application see tables</p> <p>---</p> | 1-11                  |
| A          | <p>WO 94 29350 A (THE GOVERNMENT OF THE U.S.A.) 22 December 1994 see table 8 see claims</p> <p>---</p>   | 1-11                  |
| A          | <p>WO 94 28027 A (ARCH DEVELOPMENT CORPORATION) 8 December 1994 see the whole document</p> <p>---</p>  | 1-11                  |
| A          | <p>D. KROON ET AL.: "Identification of sites of degradation in a therapeutic monoclonal antibody by peptide mapping." PHARMACEUTICAL RESEARCH, vol. 9, no. 11, November 1992, pages 1386-1393, XP002079908 Stuttgart, Deutschland see the whole document</p> <p>-----</p>  | 1-11                  |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/DE98/01409

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
See Additional Matter PCT/ISA/210
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**  

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

**PCT/DE98/01409**

Although Claims 10 (fully) and 11 (in part) relate to a method for treatment of the human or animal body, and although Claim 11 (in part) relates to a diagnostic method which is carried out on the human or animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.

| Patent document cited in search report |       | Publication date | Patent family member(s) |       | Publication date |
|--|-------|------------------|-------------------------|-------|------------------|
| WO 9429350                             | A     | 22-12-1994       | US 5747654 A            |       | 05-05-1998       |
|  |       |                  | AT 169932 T             |       | 15-09-1998       |
|  |       |                  | AU 682705 B             |       | 16-10-1997       |
|  |       |                  | AU 7246494 A            |       | 03-01-1995       |
|  |       |                  | CA 2164984 A            |       | 22-12-1994       |
|  |       |                  | DE 69412614 D           |       | 24-09-1998       |
|  |       |                  | EP 0703926 A            |       | 03-04-1996       |
|  |       |                  | JP 9502862 T            |       | 25-03-1997       |
| -----                                  | ----- | -----            | -----                   | ----- | -----            |
| WO 9428027                             | A     | 08-12-1994       | AU 7098094 A            |       | 20-12-1994       |
|  |       |                  | CA 2163989 A            |       | 08-12-1994       |
|  |       |                  | EP 0700402 A            |       | 13-03-1996       |
|  |       |                  | JP 9501824 T            |       | 25-02-1997       |
| -----                                  | ----- | -----            | -----                   | ----- | -----            |

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/01409

## A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C07K16/28 A61K39/395 G01N33/577 G01N33/574

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile   | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| X          | S. KIPRIYANOV ET AL.: "Two amino acid mutations in an anti-human CD3 single-chain Fv antibody fragment that affect the yield on bacterial secretion but not the affinity." PROTEIN ENGINEERING, Bd. 10, Nr. 4, April 1997, Seiten 445-453, XP002079905 Oxford, GB<br>siehe das ganze Dokument<br>----<br>-/- | 1-11               |

 Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung,

eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

"%" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts

7. Oktober 1998

21/10/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Nooij, F

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Tede  | Betr. Anspruch Nr. |
|-----------|--|--------------------|
| A         | S. KIPRIYANOV ET AL.: "Rapid detection of recombinant antibody fragments directed against cell-surface antigens by flow cytometry."<br>JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS,<br>Bd. 196, Nr. 1, 13. September 1996, Seiten<br>51-62, XP002079906<br>Amsterdam, NL<br>in der Anmeldung erwähnt<br>siehe "Material & Methods"<br>---                       | 1-11               |
| A         | S. DÜPEL ET AL.: "Isolation of IgG antibody Fv-DNA from various mouse and rat hybridoma cell lines using the polymerase chain reaction with a simple set of primers."<br>JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS,<br>Bd. 175, Nr. 1, 30. September 1994, Seiten<br>89-95, XP002079907<br>Amsterdam, NL<br>in der Anmeldung erwähnt<br>siehe Tabellen<br>--- | 1-11               |
| A         | WO 94 29350 A (THE GOVERNMENT OF THE U.S.A.) 22. Dezember 1994<br>siehe Tabelle 8<br>siehe Ansprüche<br>---  | 1-11               |
| A         | WO 94 28027 A (ARCH DEVELOPMENT CORPORATION) 8. Dezember 1994<br>siehe das ganze Dokument<br>---   | 1-11               |
| A         | D. KROON ET AL.: "Identification of sites of degradation in a therapeutic monoclonal antibody by peptide mapping."<br>PHARMACEUTICAL RESEARCH,<br>Bd. 9, Nr. 11, November 1992, Seiten<br>1386-1393, XP002079908<br>Stuttgart, Deutschland<br>siehe das ganze Dokument<br>-----  | 1-11               |

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/01409

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemaß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1.  Ansprüche Nr.,  
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich  
**siehe Weitere Angaben PCT/ISA/210**
2.  Ansprüche Nr.,  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen,  
daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3.  Ansprüche Nr.,  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1.  Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2.  Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3.  Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4.  Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

### Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.  
 Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/ DE 98/01409

## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Obwohl die Ansprüche 10 (völlig) und 11 (teilweise) sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, und obwohl der Anspruch 11 (teilweise) sich auf ein Diagnostizierverfahren, das am menschlichen/tierischen Körper vorgenommen wird, bezieht, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

## Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/01409

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie |            | Datum der Veröffentlichung |
|---|----------------------------|--------------------------------|------------|----------------------------|
| WO 9429350 A                                    | 22-12-1994                 | US                             | 5747654 A  | 05-05-1998                 |
|   |                            | AT                             | 169932 T   | 15-09-1998                 |
|   |                            | AU                             | 682705 B   | 16-10-1997                 |
|   |                            | AU                             | 7246494 A  | 03-01-1995                 |
|   |                            | CA                             | 2164984 A  | 22-12-1994                 |
|   |                            | DE                             | 69412614 D | 24-09-1998                 |
|   |                            | EP                             | 0703926 A  | 03-04-1996                 |
|   |                            | JP                             | 9502862 T  | 25-03-1997                 |
| -----   | -----                      | -----                          | -----      | -----                      |
| WO 9428027 A                                    | 08-12-1994                 | AU                             | 7098094 A  | 20-12-1994                 |
|   |                            | CA                             | 2163989 A  | 08-12-1994                 |
|   |                            | EP                             | 0700402 A  | 13-03-1996                 |
|   |                            | JP                             | 9501824 T  | 25-02-1997                 |
| -----   | -----                      | -----                          | -----      | -----                      |